

# 一氧化氮调控力竭运动诱导的红细胞变形能力下降的研究进展

漆秦可 王丹 李宗祥 刘燕中 蓝林飞 刘一平\*

(福建师范大学体育科学学院, 运动与健康福建省高校重点实验室, 福州 350007)

**摘要** 红细胞(red blood cell, RBC)的变形能力对于保障其氧运输功能的正常发挥具有重要作用。力竭运动导致机体缺氧, 出现氧化应激反应, 机体氧化还原失稳态, RBC膜结构被破坏。血红蛋白(hemoglobin, Hb)也将被氧化成高铁血红蛋白(methemoglobin, MetHb), 与RBC膜骨架蛋白交联并最终引起RBC变形能力下降。一氧化氮(nitric oxide, NO)不仅能够作为内皮舒张因子参与调节机体血流稳态, 近年来还发现NO具有调控RBC变形能力的功能。该文以NO调控RBC膜的氧化损伤反应为切入点, 梳理NO调控力竭运动诱导的RBC变形能力下降的作用机制, 旨在为促进力竭运动后机体氧运输功能的恢复提供理论依据。

**关键词** 一氧化氮; 红细胞变形能力; 氧化还原失稳态; 力竭运动

## Research Progress of Nitric Oxide in Regulating the Decline of Erythrocyte Deformability Induced by Exhaustive Exercise

QI Qinke, WANG Dan, LI Zongxiang, LIU Yanzhong, LAN Linfei, LIU Yiping\*

(Provincial University Key Laboratory of Sport and Health Science, Department of Physical Education and Sport Sciences, Fujian Normal University, Fuzhou 350007, China)

**Abstract** The deformability of RBC (red blood cell) plays an important role in ensuring the normal function of oxygen transport. Exhaustive exercise leads to hypoxia, oxidative stress reaction, oxidation-reduction instability and destruction of erythrocyte membrane structure. Hemoglobin will also be oxidized to methemoglobin, which will be cross-linked with erythrocyte membrane skeleton protein and eventually lead to the decline of erythrocyte deformability. Nitric oxide can not only participate in the regulation of blood flow homeostasis as an endothelial relaxing factor, but also has been found to have the function of regulating erythrocyte deformability in recent years. This article takes the regulation of nitric oxide on the oxidative damage reaction of erythrocyte membrane as the starting point, and combs the mechanism of nitric oxide regulating the decline of erythrocyte deformability induced by exhaustive exercise, in order to provide a theoretical basis for promoting the recovery of oxygen transport function after exhaustive exercise.

**Keywords** nitric oxide; erythrocyte deformability; redox instability; exhaustion exercise

收稿日期: 2022-05-12 接受日期: 2022-08-05

福建省社会科学规划课题(批准号: FJ2021B138)和中国博士后科学基金第70批面上资助(批准号: 2021M700782)资助的课题

\*通讯作者。Tel: 13600890090, E-mail: ypliu1966@126.com

Received: May 12, 2022 Accepted: August 5, 2022

This work was supported by the Research on the Social Science Planning Project of Fujian Province (Grant No.FJ2021B138) and the China Postdoctoral Science Foundation (Grant No.2021M700782)

\*Corresponding author. Tel: +86-13600890090, E-mail: ypliu1966@126.com

运动能够促进健康, 但并非只要运动必然有益于健康, 这还与运动强度、运动时间等因素有关。力竭运动作为一种十分强烈的应激原可对机体产生负面效应, 使机体发生氧化应激反应, 破坏机体氧化还原平衡, 这不仅直接损伤RBC膜的结构和功能<sup>[1]</sup>, 也会导致血红蛋白(hemoglobin, Hb)发生自氧化反应, 释放大量的氧自由基并与RBC膜骨架交联造成RBC膜结构进一步遭到破坏<sup>[2]</sup>, 最终导致RBC变形能力降低。

NO是人体内首个被发现作为信号转导介质发挥功能的气体分子<sup>[3]</sup>, 不仅可作为内皮舒张因子参与调节机体血流稳态, 近年来还发现NO能够调控RBC变形能力<sup>[67]</sup>。研究表明, 力竭运动前后适度补充NO前体左旋-精氨酸(*L*-arginine, *L*-Arg)能够促进内皮型一氧化氮合酶(endothelial nitric oxide synthase, eNOS)以及红细胞型一氧化氮合酶(erythrocyte nitric oxide synthase, RBC-NOS)的磷酸化从而增强其活性<sup>[3]</sup>, 使NO生成量增加。NO通过调控RBC膜、Hb的氧化还原反应提高RBC变形能力<sup>[4]</sup>。因此, 探究力竭运动如何导致RBC变形能力的降低以及NO恢复RBC变形能力的机制能够为今后深入研究力竭运动后机体氧运输功能的恢复提供理论支撑。

## 1 RBC变形能力与NO

### 1.1 RBC变形能力在氧运输功能中的作用

RBC是血液中数量最多的血细胞, 具有维持机体正常生命活动的氧运输功能<sup>[5]</sup>。RBC直径大于微循环中毛细血管的直径, 因此RBC必须变形才能通过这些毛细血管向组织输送氧气<sup>[6]</sup>。生理状态下, RBC呈双凹圆盘状, 具有较大的表面积/体积值, 在受到外力时容易发生形变<sup>[7]</sup>。影响RBC变形能力的因素包括RBC膜的弹性、几何形状、胞质黏度、血液剪切应力、渗透压、pH值、温度等。而力竭运动使机体长时间缺氧, 生成大量氧自由基与RBC发生反应。由于RBC自身缺乏细胞核和线粒体以及多种细胞器, 无法合成新的蛋白质<sup>[27]</sup>, 尽管RBC抗氧化能力强<sup>[4]</sup>, 但力竭运动仍使RBC抗氧化酶迅速耗竭并发生氧化损伤, 并通过降低RBC膜的弹性以及增加内黏度, 导致其变形能力下降, 从而严重影响RBC携氧功能, 损害微循环有效灌注<sup>[15]</sup>, 致使血液黏滞度增加, 法-林(Fahraeus-Lindqvist)逆效应加剧, 血流速度减慢, 血液与组织细胞间之间出现

物质交换障碍<sup>[8]</sup>。

### 1.2 NO生成量对RBC变形能力的影响

NO是一种血管内皮所衍生的舒张因子<sup>[9]</sup>, 内源性NO是由一氧化氮合酶(NOS)合成的<sup>[10]</sup>, 其功能包括使血管舒张、血压降低, 抑制血管平滑肌细胞的增生等<sup>[11]</sup>。近年来研究结果表明, NO还能够调控RBC变形能力<sup>[12]</sup>。RBC现已被确定为能够在心血管系统内可逆结合、运输和释放NO<sup>[16-17]</sup>, 并可以携带非功能性eNOS, 因此又被称为RBC-NOS, 其表达活性和功能性与eNOS相似<sup>[17]</sup>, 同样由*L*-Arg、钙离子( $\text{Ca}^{2+}$ )和磷脂酰肌醇3激酶(phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)的磷酸化调节<sup>[19,72]</sup>, 以维持RBC膜的流动性<sup>[18]</sup>, 调控RBC变形能力。STARZYK等<sup>[13]</sup>研究显示, 大鼠静脉输注eNOS抑制剂*N*-硝基-左旋精氨酸甲酯(*N*-nitro-*L*-arginine methyl ester, *L*-NAME)后, NO的释放被抑制, 导致RBC膜结构发生改变, 钾离子( $\text{K}^{+}$ )渗透增加<sup>[14]</sup>, RBC内黏度增高, 变形能力降低。NO的含量一旦高于临界浓度反而会使RBC变形能力降低<sup>[13]</sup>, 但最佳浓度的NO或NO供体对RBC变形能力的调控却有积极效应<sup>[15]</sup>, 并且有提高机体氧化还原失稳态下受损RBC变形能力的作用<sup>[15]</sup>, 因此体内维持适量浓度的NO对维持RBC变形能力十分重要。

## 2 力竭运动减少NO生成量, 降低RBC变形能力

力竭运动引起的高频、反复的血流切应力可导致机体产生大量自由基<sup>[8,22]</sup>, 致使氧化还原平衡遭到破坏<sup>[58]</sup>, NO合成的关键限速酶eNOS、RBC-NOS活性<sup>[20]</sup>降低, eNOS-mRNA的表达下调<sup>[61]</sup>, 同时机体内*L*-Arg和辅助因子等NO底物含量也会降低<sup>[3]</sup>。RBC-NOS与eNOS中有三个非常关键的磷酸化位点: Ser<sup>1177</sup>、Ser<sup>116</sup>和Thr<sup>495</sup><sup>[19,75]</sup>。Ser<sup>1177</sup>的磷酸化反应能够使eNOS、RBC-NOS活性增强<sup>[65,68,75]</sup>, 而Ser<sup>116</sup>和Thr<sup>495</sup>的磷酸化反应则使其活性减弱<sup>[19]</sup>。研究表明, 力竭运动可以激活蛋白激酶C(protein kinase C, PKC)导致Thr<sup>495</sup>磷酸化, 致使eNOS、RBC-NOS失活<sup>[21]</sup>, NO生成量减少, RBC变形能力下降。适度补充*L*-Arg可以诱导eNOS、RBC-NOS的Ser<sup>1177</sup>位点的磷酸化以及Ser<sup>116</sup>、Thr<sup>495</sup>位点的去磷酸化, 从而上调eNOS、RBC-NOS的活性, 使NO的生成量增加, 恢复RBC受损的变形能力, 但此类反应的具体机制仍需要进

一步研究<sup>[21]</sup>。

### 3 力竭运动破坏RBC膜结构,降低RBC变形能力

#### 3.1 力竭运动导致RBC膜骨架力学稳定性降低

力竭运动诱导RBC膜骨架蛋白发生氧化损伤,破坏膜骨架结构和稳定性<sup>[23]</sup>。RBC膜骨架是由复杂的蛋白分子,主要包括血影蛋白(spectrin)、肌动蛋白(actin)、连结蛋白(ankyrin)、带4.1蛋白(band 4.1)、band 4.2、band 3、肌球蛋白(myosin)、原肌球蛋白(tropomyosin)等<sup>[6]</sup>组成的网状结构,起到调节RBC形态、变形、运动及代谢的作用<sup>[23]</sup>,RBC膜骨架既可提高膜的耐用性,又可使膜能够灵活流动<sup>[29]</sup>。力竭运动使机体氧化还原失稳态导致膜骨架蛋白出现磷酸化反应,膜蛋白质羰基化增强<sup>[59]</sup>,RBC膜构象发生改变<sup>[31]</sup>,降低整个膜骨架的机械稳定性,直接破坏膜骨架结构<sup>[30]</sup>,使RBC渗透脆弱性增加,变形能力降低。

**3.1.1 力竭运动诱导spectrin氧化损伤** Spectrin是负责RBC形状、完整性和变形能力的骨架蛋白<sup>[30]</sup>,由相反方向的2条平行链( $\alpha$ 和 $\beta$ )组成,但目前关于spectrin氧化损伤的研究甚少。现有研究表明,spectrin主要由band 4.1稳定,并通过ankyrin-band 3之间的相互作用连接到脂质双分子层,维持膜骨架稳定性<sup>[72]</sup>。力竭运动诱导机体氧化还原失稳态使 $\alpha$ -spectrin和 $\beta$ -spectrin含量降低<sup>[32]</sup>,同时 $\beta$ -spectrin发生的磷酸化反应会降低膜骨架机械稳定性,导致其疏松<sup>[33]</sup>,膜骨架结构改变,RBC变形能力受损,但具体机制还需要更多研究来阐明。

**3.1.2 力竭运动诱导band 3氧化损伤** Band 3属于阴离子交换蛋白家族(anion exchanger)<sup>[34]</sup>,约占膜骨架蛋白总量的25%。Band 3将spectrin-actin固定在脂质双分子层上,并作为多种外周膜蛋白的对接点,包括band 4.1、band 4.2以及几种激酶和磷酸酶,因此是十分重要膜骨架蛋白<sup>[46]</sup>。力竭运动诱导的机体氧化还原失稳态导致band 3聚类以及含量减少,从而使RBC膜骨架重组<sup>[35]</sup>, $\text{Ca}^{2+}$ 渗入RBC, $\text{K}^{+}$ 渗出RBC<sup>[25]</sup>。细胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 浓度的增加激活了Gardos通道<sup>[25]</sup>,这是啮齿动物和人类RBC中唯一的钙激活钾通道<sup>[36]</sup>。同时RBC膜上的 $\text{Ca}^{2+}$ -ATP酶和 $\text{Na}^{+}$ - $\text{K}^{+}$ -ATP酶活性降低<sup>[37,55,76]</sup>,胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 含量迅速上升,进一步导致RBC内 $\text{K}^{+}$ 的丢失,影响阳离子稳态,使RBC脱水并收缩,内黏度上升,

变形能力下降。

Band 3发生过度磷酸化同样会导致膜骨架结构遭到破坏。Band 3的磷酸化反应是由蛋白酪氨酸激酶(protein tyrosine kinase, PTK)和蛋白质酪氨酸磷酸酶(protein tyrosine phosphatase, PTP)之间的平衡控制的,能够有效防止band 3酪氨酸磷酸化的积累<sup>[75]</sup>。 $\text{Ca}^{2+}$ 浓度增加抑制PTP活性,促使band 3过度磷酸化并激活PKC<sup>[42-43]</sup>,致使band 3与其他膜骨架蛋白解离<sup>[46]</sup>,膜流动性降低,提高RBC刚度并降低变形能力。 $\text{Ca}^{2+}$ 稳态的破坏同样会激活钙蛋白酶(calpain),降解膜上的其他蛋白质,使膜骨架重构<sup>[38]</sup>。

机体氧化还原失稳态会激活胱天蛋白酶-3(caspase-3),引起RBC变形能力降低甚至凋亡。在生理状态下,caspase-3处于亚硝基化状态,活性非常低<sup>[39]</sup>;机体氧化还原稳态的失衡激活了RBC中的caspase-3<sup>[40]</sup>,使其去亚硝基化,这会导致band 3裂解<sup>[41]</sup>。而这一反应已被证明可以诱导通常位于RBC膜内表面的磷脂酰丝氨酸(phosphatidylserine, PS)暴露在膜外表面<sup>[36,40,44]</sup>,进而被巨噬细胞识别,最终引起RBC凋亡。由此可见,力竭运动引起机体氧化还原失稳态,造成band 3的裂解及聚簇,这是破坏RBC膜骨架结构,降低其变形能力关键因素。

**3.1.3 力竭运动诱导band 4.1、band 4.2蛋白氧化损伤** 生理状态下band 4.1与spectrin-actin结合,形成高亲和力三元复合物,以维持RBC膜骨架稳定性<sup>[45]</sup>。力竭运动诱导机体氧化还原失稳态,使spectrin-actin-band 4.1的水平交界点膜骨架网络发生特定改变<sup>[47]</sup>。Band 3磷酸化激活的PKC同样导致band 4.1、band 4.2磷酸化,使其与spectrin-actin形成三元复合物的能力下降,膜骨架机械稳定性降低,变得松弛<sup>[48]</sup>。Band 4.2能够与band 3和ankyrin结合,稳定ankyrin,从而附着在细胞膜的内表面,使膜骨架蛋白与细胞膜紧密连结<sup>[49]</sup>。氧化还原失稳态下band 4.2的含量下降,同时ankyrin的磷酸化可降低spectrin与band 3的结合,导致膜骨架和脂质双分子层趋向分离<sup>[49]</sup>,扰乱RBC膜骨架的排列。

#### 3.2 力竭运动诱导Hb氧化与RBC膜骨架结构交联

力竭运动诱导Hb发生自氧化反应,破坏RBC膜骨架蛋白结构。Hb占RBC蛋白中的95%至97%<sup>[38,50]</sup>,是由 $\alpha$ 和 $\beta$ 链组成的四聚体蛋白<sup>[50]</sup>,也是保证RBC完成运输功能的重要载体。力竭运动导致机体处于缺氧状态<sup>[27]</sup>,同时伴随Hb自氧化反应增加<sup>[2]</sup>,这是导致

RBC氧化还原失稳态的主要原因<sup>[51]</sup>。在机体氧化还原平衡遭到破坏期间, Hb被氧化为MetHb<sup>[1,53]</sup>, 对氧气的亲和力急剧下降<sup>[38]</sup>, 严重影响其携氧能力并释放超氧阴离子自由基( $\cdot\text{O}_2^-$ )<sup>[52]</sup>, 进一步破坏机体氧化还原稳态。

正常情况下Hb与band 3的氨基端结合, 但MetHb生成后, 其与band 3有更高的亲和力, 与膜骨架蛋白交联聚合或形成二硫键( $-\text{S}-\text{S}-$ ), 沉积在细胞膜内侧, 破坏spectrin-actin-band 4.1稳定性<sup>[31]</sup>, 并造成ankyrin的损失<sup>[55]</sup>, 导致膜骨架蛋白延展性降低<sup>[53]</sup>, 维持膜功能的蛋白酶活性下降<sup>[55]</sup>, 蛋白质功能被直接损伤, 降低RBC变形能力<sup>[54]</sup>。

### 3.3 力竭运动降低RBC膜脂质、脂蛋白流动性

力竭运动诱导膜脂质与膜蛋白的过氧化反应<sup>[28]</sup>同样会降低RBC变形性。RBC膜脂质中磷脂占73%、胆固醇占25%、糖脂占5%<sup>[6]</sup>, 其重要特征是各种磷脂的不对称分布, 这更有利于膜的流动<sup>[6]</sup>。力竭运动后磷脂的不对称分布遭到破坏, 同时RBC膜磷脂中的不饱和脂肪酸发生过氧化反应<sup>[32]</sup>, 导致不饱和脂肪酸比例减少。不饱和脂肪酸易弯曲, 排列疏松, 抗氧化强, 因此不饱和脂肪酸较多时RBC膜流动性强<sup>[3]</sup>; 饱和脂肪酸链不易弯曲, 有序性强<sup>[56]</sup>, 流动性低。由于不饱和脂肪酸减少, 使膜成晶态, 导致膜流动性降低<sup>[56]</sup>, 膜磷脂组成产生变化, RBC膜分子结构发生改变, 胆固醇/磷脂比值增大。在相变温度下, 胆固醇含量越多, RBC膜流动性越低<sup>[57]</sup>, 导致RBC膜硬度增加。

RBC膜蛋白含有大量的巯基( $-\text{SH}$ ), 维持膜蛋白的正常功能<sup>[67]</sup>。在力竭运动诱导的机体氧化还原失稳态下, 膜蛋白的 $-\text{SH}$ 含量显著下降, 并且 $-\text{SH}$ 极易被氧化成形成 $-\text{S}-\text{S}-$ 而交联, 使蛋白质构象发生改变, 最终导致RBC渗透脆性增加<sup>[68]</sup>。研究表明, 活性氧(reactive oxygen species, ROS)可以激活内源性蛋白酶, 使RBC膜蛋白降解、失活、交联<sup>[58]</sup>, 膜蛋白分子重组, 脂质双分子层过氧化加剧<sup>[59]</sup>。由于蛋白质和脂质遭到损伤, 且蛋白酶和磷脂酶的活性增强, 因此, 受损蛋白质被进一步分解, 从而破坏RBC膜骨架蛋白附着在细胞膜上的部位<sup>[41,60]</sup>, 最终导致RBC的变形能力降低。虽然脂质双分子层和RBC细胞骨架都能影响RBC膜力学行为, 但是膜骨架的物理特性仍是膜黏性和弹性特性的主要决定因素<sup>[14,23-24]</sup>。

## 4 NO提高RBC膜骨架结构稳定性

### 4.1 NO诱导的S-亚硝基化反应

NO通过诱导RBC膜骨架蛋白及Hb的S-亚硝基化反应以增强RBC变形能力。S-亚硝基化是指NO及其衍生物修饰蛋白质的半胱氨酸自由巯基, 是一种氧化还原依赖的蛋白质翻译后修饰<sup>[62,69]</sup>。这种翻译后修饰是可逆的, 与磷酸化修饰有着许多相同的靶蛋白, 而NO则通过S-亚硝基化广泛参与细胞的信号转导<sup>[62]</sup>。S-亚硝基化将影响蛋白质的功能、位置和稳定性<sup>[63]</sup>, 因此, NO既通过直接与RBC膜骨架蛋白发生S-亚硝基化反应, 提高膜骨架稳定性, 也能够与Hb发生S-亚硝基化反应避免膜骨架蛋白发生交联, 维持膜骨架结构, 防止它们被ROS进一步氧化修饰<sup>[67]</sup>, 提高已受损RBC的变形能力。

### 4.2 NO诱导RBC膜骨架蛋白的S-亚硝基化反应

研究表明, NO对RBC膜骨架蛋白 $\alpha$ -和 $\beta$ -spectrin有着S-亚硝基化修饰作用<sup>[64,68,71,78]</sup>, 但关于NO如何稳定spectrin的具体机制文章非常有限, NO对spectrin的亚硝基化作用对RBC结构和功能特性的定位和影响需要进一步研究<sup>[65]</sup>。

NO也与RBC骨架band 3的氨基末端细胞质域有特异性高亲和力, NO对band 3的S-亚硝基化作用对RBC变形能力的提高十分重要。NO可以在氧化还原失稳态下减少band 3的酪氨酸磷酸化反应, 其机制可能是NO与RBC表面特定的硫醇相互作用从而诱导其S-亚硝基化, 激活 $\text{Ca}^{2+}$ -ATP泵的同时抑制 $\text{Ca}^{2+}$ 通道, 减少 $\text{Ca}^{2+}$ 进入细胞<sup>[61]</sup>, 阻止Gardos通道的激活<sup>[25,66]</sup>, 维持跨膜band 3与ankyrin-spectrin的结合稳定性, 抑制band 3的聚簇化维持RBC膜骨架结构<sup>[67]</sup>, 恢复受损RBC的变形能力<sup>[68]</sup>。NO也可以通过减少氧化还原失稳态下band 3的交联来防止RBC变形能力降低, 防止游离硫醇的氧化来缓解膜脂质过氧化和蛋白质磷酸化的程度<sup>[69]</sup>。NO与RBC膜蛋白巯基的S-亚硝基化反应也能够抑制caspase 3的活性<sup>[70,78]</sup>, 维持RBC中 $\text{Ca}^{2+}$ 稳态, 防止因band 3裂解引起的RBC变形能力降低及细胞凋亡。研究也表明NO能够缓解氧化损伤导致的RBC膜蛋白 $-\text{SH}$ 氧化, 恢复膜蛋白 $-\text{SH}$ 含量<sup>[76]</sup>, 提高脂质双分子层流动性<sup>[77]</sup>, 但其机制仍相对缺乏。

### 4.3 NO诱导的Hb-S-亚硝基化反应恢复RBC膜骨架结构

NO不仅能直接修饰RBC膜骨架蛋白<sup>[68]</sup>, 而且其

诱导的Hb-S-亚硝基化反应也能够通过阻止MetHb与band 3结合间接维持RBC膜骨架蛋白结构。NO与氧合血红蛋白(HbO<sub>2</sub>)结合形成亚硝酸盐(NO<sub>2</sub><sup>-</sup>), NO<sub>2</sub><sup>-</sup>是体内NO的生物利用储存池<sup>[69]</sup>, 能被Hb生物活化<sup>[71]</sup>。一旦HbO<sub>2</sub>释放氧气, 形成脱氧血红蛋白(deoxy Hb), deoxy Hb就会充当亚硝酸盐还原酶(nitrite reductase, NiR), 将NO<sub>2</sub><sup>-</sup>转化为S-亚硝基硫醇(S-nitrosothiol, SNO)<sup>[72]</sup>, 从血红素转移到Hb中保守的Beta93Cys残基并结合, 形成S-亚硝基化血红蛋白(SNO-Hb)<sup>[73]</sup>。Hb发生S-亚硝基化, 即S-亚硝基硫醇形成产生SNO-Hb的主要部位是Hb中反应最强的半胱氨酸Beta93Cys<sup>[74]</sup>。SNO-Hb既可充当NO的载体, 同时NO所诱导的S-亚硝基化也能减少MetHb与band 3的结合并使其去磷酸化<sup>[75]</sup>。Band 3是SNO-Hb在RBC上的特异性结合靶点, SNO-Hb与band 3结合, 防止MetHb与band 3结合, 恢复膜骨架结构, 且可在一定程度上提高力竭运动诱导的受损RBC的变形能力。同时Hb会发生T态构象变化, 释放氧气, 导致T态Hb-Beta93Cys-SNO将部分SNO转移到其他细胞硫醇上, 使血管扩张<sup>[75-76]</sup>, 提高RBC氧运输效率。

## 5 总结与展望

### 5.1 总结

力竭运动机体长时间缺氧而导致氧化还原失稳态, RBC发生氧化损伤, 进而导致变形能力降低。一方面RBC膜骨架蛋白发生磷酸化反应, 结构发生改变, 稳定性降低; 另一方面Hb被氧化为MetHb, 它与RBC膜骨架交联、聚簇, 这同样会导致RBC的变形能力下降, RBC氧运输功能受到严重影响, 与组织细胞之间的物质交换受阻。NO能够调控力竭运动后受损RBC的变形能力。NO与Hb发生S-亚硝基化反应形成SNO-Hb并防止膜骨架与MetHb结合, 恢复RBC膜骨架蛋白结构, 同时也能促进NO的进一步释放, 提高RBC变形能力。NO也能够与RBC膜骨架蛋白直接发生S-亚硝基化反应, 从而维持RBC中Ca<sup>2+</sup>浓度, 降低蛋白酶活性, 防止膜蛋白交联聚簇, 维持膜骨架结构, 有利于恢复受损RBC的变形能力, 增强RBC氧运输功能。因此, NO在恢复力竭运动诱导的RBC变形能力下降以及改善机体氧运输系统功能中扮演着不可忽视的关键角色。

### 5.2 展望

力竭运动诱导RBC变形能力下降, 损伤机体氧

运输系统功能。NO虽然能够调控RBC变形能力, 但其机制十分复杂, spectrin、band 4.1、band 4.2等对维持膜骨架的机械稳定性同样起着重要作用, 现有研究尚未完全阐明NO对上述膜骨架蛋白的调控机制。因此NO与RBC膜骨架蛋白中spectrin、band 4.1、band 4.2等膜骨架蛋白发生的S-亚硝基化反应以及其如何调控RBC变形能力的机制等相关研究, 为力竭运动后机体氧运输功能的恢复从细胞、分子层面开辟新视角。

## 参考文献 (References)

- [1] MEDEIROS-LIMA D J, MENDES-RIBEIRO A C, BRUNINI T M, et al. Erythrocyte nitric oxide availability and oxidative stress following exercise [J]. Clin Hemorheol Microcirc, 2017, 65(3): 219-28.
- [2] WANG X, WU Z, SONG G, et al. Effects of oxidative damage of membrane protein thiol groups on erythrocyte membrane viscoelasticities [J]. Clin Hemorheol Microcirc, 1999, 21(2): 137-46.
- [3] 刘利新. 一次递增负荷至力竭运动对经过训练的男性田径运动员红细胞变形能力和eNOS的影响[J]. 北京体育大学学报(LIU L X. Effects of a single out of incremental and exhaustive exercise on erythrocyte deformability and eNOS in training male elite athletes [J]. Journal of Beijing Sport University), 2011, 34(4): 54-6.
- [4] KUHN V, DIEDERICH L, KELLER TCS 4 T H, et al. Red blood cell function and dysfunction: redox regulation, nitric oxide metabolism, anemia [J]. Antioxid Redox Signal, 2017, 26(13): 718-42.
- [5] 张紫薇, 周晓芳, 郭建荣. 高血糖对红细胞理化性质及免疫功能影响的研究进展[J]. 临床输血与检验(ZHANG Z W, ZHOU X F, GUO J R. Research Progress on the effects of hyperglycemia on the physicochemical properties and immune function of erythrocytes [J]. Journal of Clinical Transfusion and Laboratory Medicine), 2021, 23(5): 677-80.
- [6] 陈文鹤, 郭黎. 红细胞膜结构与红细胞变形能力[J]. 上海体育学院学报(CHEN W H, GUO L. Red cell membrane structure and erythrocyte deformability [J]. Journal of Shanghai Physical Education Institute), 2001(4): 34-9.
- [7] MOHANDAS N, GALLAGHER P G. Red cell membrane: past, present, and future [J]. Blood, 2008, 112(10): 3939-48.
- [8] 陈文鹤, 郭黎. 运动、红细胞膜与红细胞变形能力[J]. 中国运动医学杂志(CHEN W H, GUO L. Exercise, erythrocyte membrane and erythrocyte deformability [J]. Chinese Journal of Sports Medicine), 2002, 21(4): 396-9.
- [9] 万函, 王秀芬, 杨美雯, 等. 一氧化氮信号通路与动脉粥样硬化[J]. 南昌大学学报(医学版)(WAN H, WANG X F, YANG M W, et al. Nitric oxide signaling pathway and atherosclerosis [J]. Journal of Nanchang University, Medical Edition), 2021, 61(5): 72-8.
- [10] UYUKLU M, MEISELMAN H J, BASKURT O K. Role of hemoglobin oxygenation in the modulation of red blood cell mechanical properties by nitric oxide [J]. Nitric Oxide, 2009, 21(1): 20-6.

- [11] TENOPOULOU M, DOULIAS P T. Endothelial nitric oxide synthase-derived nitric oxide in the regulation of metabolism [J]. *F1000Res*, 2020, doi: F1000 Faculty Rev-1190.
- [12] JUBELIN B C, GIERMAN J L. Erythrocytes may synthesize their own nitric oxide [J]. *Am J Hypertens*, 1996, 9(12Pt1): 1214-9.
- [13] STARZYK D, KORBUT R, GRYGLEWSKI R J. The role of nitric oxide in regulation of deformability of red blood cells in acute phase of endotoxaemia in rats [J]. *J Physiol Pharmacol*, 1997, 48(4): 731-5.
- [14] BOR-KUCUKATAY M, WENBY R B, MEISELMAN H J, et al. Effects of nitric oxide on red blood cell deformability [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2003, 284(5): H1577-84.
- [15] 桂林, 黄远帅, 李代渝. 一氧化氮对库存悬浮红细胞变形性的影响[J]. *现代预防医学*(GUI L, HUANG Y S, LI D Y. Effect of nitric oxide on deformability of stored suspended erythrocytes [J]. *Modern Preventive Medicine*), 2015, 42(16): 3001-3,44.
- [16] FISCHER U M, SCHINDLER R, BRIXIUS K, et al. Extracorporeal circulation activates endothelial nitric oxide synthase in erythrocytes [J]. *Ann Thorac Surg*, 2007, 84(6): 2000-3.
- [17] KLEINBONGARD P, SCHULZ R, RASSAF T, et al. Red blood cells express a functional endothelial nitric oxide synthase [J]. *Blood*, 2006, 107(7): 2943-51.
- [18] CARVALHO F A, MARIA A V, BRAZ NOGUEIRA J M, et al. The relation between the erythrocyte nitric oxide and hemorheological parameters [J]. *Clin Hemorheol Microcirc*, 2006, 35(1/2): 341-7.
- [19] 黄红梅, 屈金亭, 刘涛. 不同运动强度对男子赛艇运动员红细胞内皮型一氧化氮合酶的影响[J]. *中国体育科技*(HUANG H M, QU J T, LIU T. Effect of different exercise intensity on erythrocyte endothelial nitric oxide synthase in male rowers [J]. *China Sports Science and Technology*), 2010, 46(4): 73-5,85.
- [20] SUHR F, PORTEN S, HERTRICH T, et al. Intensive exercise induces changes of endothelial nitric oxide synthase pattern in human erythrocytes [J]. *Nitric Oxide*, 2009, 20(2): 95-103.
- [21] 曹慧, 王海平, 卓海龙, 等. 精氨酸对库存红细胞eNOS的影响作用研究[J]. *医学分子生物学杂志*(CAO H, WANG H P, ZHUO H L, et al. Effect of arginine on eNOS in stored erythrocytes [J]. *Journal of Medical Molecular Biology*), 2012, 9(5): 333-7.
- [22] 金丽, 田野, 赵杰修, 等. 大鼠运动性贫血时以及营养干预对红细胞膜脂质过氧化的影响[J]. *体育科学*(JIN L, TIAN Y, ZHAO X J, et al. Effects of exercise anemia and nutritional intervention on erythrocyte membrane lipid peroxidation in rats [J]. *China Sport Science*), 2005(8): 75-8.
- [23] CHASIS J A, MOHANDAS N. Erythrocyte membrane deformability and stability: two distinct membrane properties that are independently regulated by skeletal protein associations [J]. *J Cell Biol*, 1986, 103(2): 343-50.
- [24] DIEDERICH L, SUVORAVA T, SANSONE R, et al. On the effects of reactive oxygen species and nitric oxide on red blood cell deformability [J]. *Front Physiol*, 2018, 9: 332.
- [25] MAO T Y, FU L L, WANG J S. Hypoxic exercise training causes erythrocyte senescence and rheological dysfunction by depressed Gardos channel activity [J]. *J Appl Physiol*, 2011, 111(2): 382-91.
- [26] FUJII J, HOMMA T, KOBAYASHI S, et al. Erythrocytes as a preferential target of oxidative stress in blood [J]. *Free Radic Res*, 2021, 55(5): 562-80.
- [27] PANDEY K B, RIZVI S I. Biomarkers of oxidative stress in red blood cells [J]. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*, 2011, 155(2): 131-6.
- [28] 兰玉艳, 李岩. 白鲜皮提取物对红细胞氧化损伤的抑制作用[J]. *中国老年学杂志*(LAN Y Y, LI Y. Inhibitory effect of extracts from cortex dictamni on oxidative damage of erythrocytes [J]. *Chinese Journal of Gerontology*), 2019, 39(23): 5810-58.
- [29] 卢义钦, 刘俊凡. 红细胞膜蛋白与膜骨架[J]. *生命科学研究*(LU Y Q, LIU J F. Erythrocyte membrane proteins and membrane skeleton [J]. *Life Science Research*), 2005, 9(4): 283-91.
- [30] OLSZEWSKA M, WIATROW J, BOBER J, et al. Oxidative stress modulates the organization of erythrocyte membrane cytoskeleton [J]. *Postepy Hig Med Dosw*, 2012, 66: 534-42.
- [31] JAROLIM P, LAHAV M, LIU S C, et al. Effect of hemoglobin oxidation products on the stability of red cell membrane skeletons and the associations of skeletal proteins: correlation with a release of hemin [J]. *Blood*, 1990, 76(10): 2125-31.
- [32] 洪平, 李开刚, 冯连世. 大强度训练及恢复后大鼠红细胞变形能力和红细胞膜蛋白的变化[J]. *中国应用生理学杂志*(HONG P, LI K G, FENG L S. Changes of erythrocyte deformability and erythrocyte membrane protein in rats after intensive training and recovery [J]. *Chinese Journal of Applied Physiology*), 2002(3): 62-6.
- [33] MANNO S, TAKAKUWA Y, NAGAO K, et al. Modulation of erythrocyte membrane mechanical function by beta-spectrin phosphorylation and dephosphorylation [J]. *J Biol Chem*, 1995, 270(10): 5659-65.
- [34] 余果宇, 田兴亚. 红细胞膜带3蛋白酪氨酸磷酸化的研究进展[J]. *国外医学(临床生物化学与检验学分册)*(YU G Y, TIAN X Y. Progress in tyrosine phosphorylation of erythrocyte membrane band 3 protein [J]. *Foreign medicine Clinical Biochemistry and Laboratory Science*), 2004, 25(2): 169-71.
- [35] SINHA A, CHU T T, DAO M, et al. Single-cell evaluation of red blood cell bio-mechanical and naNO-structural alterations upon chemically induced oxidative stress [J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 9768.
- [36] LANG K S, DURANTON C, POEHLMANN H, et al. Cation channels trigger apoptotic death of erythrocytes [J]. *Cell Death Differ*, 2003, 10(2): 249-56.
- [37] 余群, 邱烈峰, 王丽平, 等. 间歇低氧暴露对运动性低血红蛋白大鼠血液抗氧化能力的影响[J]. *暨南大学学报(自然科学与医学版)*(YU Q, QIU L F, WANG L P. Effect of intermittent hypoxic exposure on blood antioxidant capacity in exercise-induced hypohemoglobin rats [J]. *Journal of Jinan University Natural, Science and Medicine Edition*), 2014, 35(5): 474-8.
- [38] RIFKIND J M, NAGABABU E. Hemoglobin redox reactions and red blood cell aging [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2013, 18(17): 2274-83.
- [39] 张晓静, 丛斌. 蛋白质巯基亚硝基化对细胞功能的调控作用[J]. *中国病理生理杂志*(ZHANG X J, CONG B. Regulation of protein sulfhydryl nitrosylation on cell function [J]. *Chinese Journal of Pathophysiology*), 2011, 27(11): 2237-40.
- [40] MOHANTY J G, NAGABABU E, RIFKIND J M. Red blood cell oxidative stress impairs oxygen delivery and induces red blood cell aging [J]. *Front Physiol*, 2014, 5: 84.
- [41] SUZUKI Y, OHKUBO N, AOTO M, et al. Participation of cas-

- pase-3-like protease in oxidation-induced impairment of erythrocyte membrane properties [J]. *Biorheology*, 2007, 44(3): 179-90.
- [42] ZIPSER Y, PIADÉ A, BARBUL A, et al.  $Ca^{2+}$  promotes erythrocyte Band 3 tyrosine phosphorylation via dissociation of phosphotyrosine phosphatase from Band 3 [J]. *Biochem J*, 2002, 368(Pt 1): 137-44.
- [43] TANG F, REN Y, WANG R, et al. Ankyrin exposure induced by activated protein kinase C plays a potential role in erythrophagocytosis [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2016, 1860(1 Pt A): 120-8.
- [44] MANDAL D, MAZUMDER A, DAS P, et al. Fas-, caspase 8-, and caspase 3-dependent signaling regulates the activity of the aminophospholipid translocase and phosphatidylserine externalization in human erythrocytes [J]. *J Biol Chem*, 2005, 280(47): 39460-7.
- [45] OHANIAN V, WOLFE L C, JOHN K M, et al. Analysis of the ternary interaction of the red cell membrane skeletal proteins spectrin, actin, and 4.1 [J]. *Biochemistry*, 1984, 23(19): 4416-20.
- [46] FERRU E, GIGER K, PANTALEO A, et al. Regulation of membrane-cytoskeletal interactions by tyrosine phosphorylation of erythrocyte Band 3 [J]. *Blood*, 2011, 117(22): 5998-4006.
- [47] CAPRARI P, BOZZI A, MALORNI W, et al. Junctional sites of erythrocyte skeletal proteins are specific targets of tert-butylhydroperoxide oxidative damage [J]. *Chem Biol Interact*, 1995, 94(3): 243-58.
- [48] MANNO S, TAKAKUWA Y, MOHANDAS N. Modulation of erythrocyte membrane mechanical function by protein 4.1 phosphorylation [J]. *J Biol Chem*, 2005, 280(9): 7581-7.
- [49] 彭激雁, 王翔, 高玮, 等. 红细胞膜带4.2蛋白的结构与功能[J]. *细胞生物学杂志*(PENG J Y, WANG X, GAO W, et al. Structure and function of erythrocyte membrane band 4.2 protein [J]. *Journal of Cell Biology*), 2007, 29(5): 687-91.
- [50] AHMED M H, GHATGE M S, SAFO M K. Hemoglobin: structure, function and allostery [J]. *Subcell Biochem*, 2020, 94: 345-82.
- [51] DEI ZOTTI F, VERDOY R, BRUSA D, et al. Redox regulation of nitrosyl-hemoglobin in human erythrocytes [J]. *Redox Biol*, 2020, 34: 101399.
- [52] GWOZDZINSKI K, PIENIAZEK A, GWOZDZINSKI L. Reactive oxygen species and their involvement in red blood cell damage in chronic kidney disease [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2021, 2021: 6639199.
- [53] WELBOURN E M, WILSON M T, et al. The mechanism of formation, structure and physiological relevance of covalent hemoglobin attachment to the erythrocyte membrane [J]. *Free Radic Biol Med*, 2017, 103: 95-106.
- [54] 王永彬, 范华骅, 杨懿铭. 血红蛋白类氧载体研究现状[J]. *生物学杂志*(WANG Y B, FAN H Y, YANG Y M. Research status of hemoglobin oxygen carriers [J]. *Journal of Biology*), 2009, 26(2): 51-3.
- [55] ARASHIKI N, KIMATA N, MANNO S, et al. Membrane peroxidation and methemoglobin formation are both necessary for band 3 clustering: mechanistic insights into human erythrocyte senescence [J]. *Biochemistry*, 2013, 52(34): 5760-9.
- [56] 龙璘, 苏海. 细胞膜脂肪酸与心血管疾病[J]. *国际心血管病杂志*(LONG H, SU H. Cell membrane fatty acids and cardiovascular diseases [J]. *International Journal of Cardiovascular Diseases*), 2007, 34(2): 119-22.
- [57] 衣雪洁, 常波, 许豪文. 力竭游泳对红细胞膜的影响[J]. *中国运动医学杂志*(YI X J, CHANG B, XU H W. Effect of exhaustive swimming on erythrocyte membrane [J]. *Chinese Journal of Sports Medicine*), 2001, 20(2): 139-41.
- [58] 黄园, 陈志庆, 邱卓君, 等. 高强度无氧运动对血液和红细胞氧化应激水平的影响[J]. *中国运动医学杂志*(HUANG Y, CHEN Z Q, QIU Z J. Effect of high intensity anaerobic exercise on oxidative stress in blood and red blood cells [J]. *Chinese Journal of Sports Medicine*), 2003(1): 78-80.
- [59] REVIN V V, GROMOVA N V, REVINA E S, et al. Effects of polyphenol compounds and nitrogen oxide donors on lipid oxidation, membrane-skeletal proteins, and erythrocyte structure under hypoxia [J]. *Biomed Res Int*, 2019, 2019: 6758017.
- [60] FUJINO T, ISHIKAWA T, INOUE M, et al. Characterization of membrane-bound serine protease related to degradation of oxidatively damaged erythrocyte membrane proteins. *Biochim Biophys Acta*, 1998, 1374(1/2): 47-55.
- [61] 柏建清, 赵元吉, 姜振. 力竭运动对力量型和耐力型少年运动员血中内皮素和一氧化氮的影响[J]. *北京体育大学学报*(BO J Q, ZHAO Y J, JIANG Z. Effect of exhaustive exercise on endothelin and nitric oxide in blood of strength and endurance juvenile athletes [J]. *Journal of Beijing Sport University*), 2004, 27(12): 1642-4.
- [62] 黄波, 陈畅. 一氧化氮的功能及其作用机制(II)——蛋白质巯基亚硝基化修饰 [J]. *生物物理学报*(HUANG B, CHEN C. The function and mechanism of nitric oxide (II): protein sulfhydryl nitrosylation modification [J]. *Acta Biophysica Sinica*), 2012, 28(4): 268-77.
- [63] GOULD N, DOULIAS P T, TENOPOULOU M, et al. Regulation of protein function and signaling by reversible cysteine S-nitrosylation [J]. *J Biol Chem*, 2013, 288(37): 26473-9.
- [64] TSUDA K, KIMURA K, NISHIO I, et al. Nitric oxide improves membrane fluidity of erythrocytes in essential hypertension: an electron paramagnetic resonance investigation [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000, 275(3): 946-54.
- [65] BARBARINO F, WÄSCHENBACH L, CAVALHO-LEMOS V, et al. Targeting spectrin redox switches to regulate the mechano-properties of red blood cells [J]. *Biol Chem*, 2020, 402(3): 317-31.
- [66] BARODKA V, MOHANTY J G, MUSTAFA A K, et al. Nitroprusside inhibits calcium-induced impairment of red blood cell deformability [J]. *Transfusion*, 2014, 54(2): 434-44.
- [67] 赵押金. 一氧化氮在红细胞缺氧适应与损伤中的作用及机制研究[D]. 重庆: 重庆大学(ZHAO Y J. Role and mechanism of nitric oxide in hypoxic adaptation and injury of erythrocytes [J]. Chongqing: Chongqing University), 2018.
- [68] GRAU M, PAULY S, ALI J, et al. RBC-NOS-dependent S-nitrosylation of cytoskeletal proteins improves RBC deformability [J]. *PLoS One*, 2013, 8(2): e56759.
- [69] ZHAO Y, WANG X, WANG R, et al. Nitric oxide inhibits hypoxia-induced impairment of human RBC deformability through reducing the cross-linking of membrane protein Band 3 [J]. *J Cell Biochem*, 2019, 120(1): 305-20.
- [70] CHOWDHURY K D, SEN G, BISWAS T. Regulatory role of nitric oxide in the reduced survival of erythrocytes in visceral leishmaniasis [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2010, 1800(9): 964-76.
- [71] BIZJAK D A, BRINKMANN C, BLOCH W, et al. Increase in

- red blood cell-nitric oxide synthase dependent nitric oxide production during red blood cell aging in health and disease: a study on age dependent changes of rheologic and enzymatic properties in red blood cells [J]. *PLoS One*, 2015, 10(4): e0125206.
- [72] GLADWIN M T. How red blood cells process nitric oxide: evidence for the nitrite hypothesis [J]. *Circulation*, 2017, 135(2): 177-9.
- [73] SUN J, STEENBERGEN C, MURPHY E. S-nitrosylation: NO-related redox signaling to protect against oxidative stress [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2006, 8(9/10): 1693-705.
- [74] PREMONT R T, STAMLER J S. Essential role of hemoglobin  $\beta$ cys93 in cardiovascular physiology [J]. *Physiology*, 2020, 35(4): 234-43.
- [75] ZHAO Y, WANG X, NOVIANA M, et al. Nitric oxide in red blood cell adaptation to hypoxia [J]. *Acta Biochim Biophys Sin*, 2018, 50(7): 621-34.
- [76] 李敏, 曹志发. 有氧耐力训练大鼠定量运动后红细胞的氧化应激[J]. *体育学刊*(LI M, CAO Z F. Oxidative stress of erythrocytes in aerobic endurance training rats after quantitative exercise [J]. *Journal of Physical Education*), 2006(4): 50-2.
- [77] BRZESZCZYNSKA J, GWOZDZINSKI K. Nitric oxide induced oxidative changes in erythrocyte membrane components [J]. *Cell Biol Int*, 2008, 32(1): 114-20.
- [78] SIMMONDS M J, DETTERICH J A, CONNES P. Nitric oxide, vasodilation and the red blood cell [J]. *Biorheology*, 2014, 51(2/3): 121-4.